

## Efecto de la ciclosporina A sobre la vascularización del tejido cicatrizal

P. Múgica\*, L. García-Alonso\*\*, V. Portugal\*\*, J. Bilbao\*\*, I. López de Tejada\* y J. Méndez\*\*

\* Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco. Servicio de Cirugía General (Dr. S. Múgica Barreiro). Hospital San Eloy.

\*\* Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco. Servicio de Cirugía General B (Prof. Dr. J. Méndez Martín). Hospital de Basurto.

### Resumen

Se estudia el posible efecto negativo de la ciclosporina sobre el desarrollo vascular en el tejido cicatrizal de la línea alba del conejo. En muestras extraídas 7 días después de la laparotomía se cuantifica la superficie de cada uno de los vasos presentes, calculándose el número de vasos (densidad vascular) y el porcentaje de superficie tisular ocupada por vasos (%AV). En los animales tratados con CsA se ha observado un aumento del %AV acompañado de un descenso en la densidad vascular, sin que estas variaciones alcancen significación estadística. Considerando tres poblaciones de vasos, en función de su calibre, se observa que la CsA aumenta significativamente el %AV y la densidad vascular en los grandes, sin modificar el resto. Por su parte, el vehículo utilizado para disolver la CsA (Intralipid) ha disminuido ambos parámetros en los vasos pequeños. Se concluye que la CsA no ha perjudicado la vascularización del tejido cicatrizal.

**Palabras clave:** Cicatrización. Vascularización. Ciclosporina. Conejo.

### EFFECT OF CYCLOSPORIN A ON NEOVASCULARIZATION IN WOUND HEALING

The possible negative effects of cyclosporin (CsA) on wound revascularization has been studied in the "linea alba" in rabbits. In samples taken 7 days after laparotomy, the surface area of each vessel was determined, as was the number of vessels (vascular density: VD) and the percentage of tissue area occupied by vessels (% VT). In animals treated with CsA, an increase in % VT has been observed, accompanied by a decrease in VD, neither of which was statistically significant. When the animals are divided into three populations on the basis of vessel lumen, it is seen that CsA significantly increases the % AV and the VD in the large-caliber vessels, but does not modify the rest. On the other hand, the vehicle used to dissolve CsA (Intralipid) reduced both parameters in small-caliber vessels. It is concluded that CsA has not impaired neovascularization of the wound.

**Key words:** Wound healing. Neovascularization. Cyclosporin. Rabbit.

### Introducción

La cicatrización de las heridas es, en esencia, un proceso inflamatorio en el que la angiogénesis desempeña un papel primordial. Una vez establecida la lesión se produce una extravasación de sangre. La polimerización del fibrinógeno ocasiona la formación de una malla de fibrina que es uno de los primeros

fenómenos que ocurren en el foco lesional, y que se elabora a expensas de la sangre extravasada<sup>1</sup>. Formando parte de esta red de fibrina, y entretejida con ella, se encuentra la fibronectina<sup>2</sup>. Dicha red de fibrina-fibronectina servirá de guía para la proliferación de los capilares neoformados.

La CsA viene siendo utilizada, cada vez con mayor frecuencia, por su marcada acción inmunosupresora. Usada por primera vez en la clínica humana por Calne en 1978<sup>3</sup>, se pensó inicialmente que debería afectar negativamente a la cicatrización, al igual que otros fármacos inmunosupresores: corticoides<sup>4-7</sup> y azatiopina<sup>6,8</sup>. Sin embargo, su acción sobre el proceso de cicatrización no está todavía aclarado. Unos autores niegan que el fármaco tenga efectos negativos en la cicatrización<sup>6-11</sup>, mientras que otros afirman que retrasa significativamente dicho proceso<sup>12</sup>. En un trabajo anterior<sup>13</sup> hemos observado que la CsA

Correspondencia: Dr. P. Múgica.  
Laboratorio de Cirugía Experimental.  
Facultad de Medicina y Odontología.  
Bº Sarriena, s/n 48940. Lejona.

Aceptado para su publicación el 12 de abril de 1993.

disminuye la resistencia tensil en heridas laparotómicas, situación que se acompaña de una disminución de la población fibroblástica del tejido cicatrizal. El hecho de que la CsA tenga efectos nocivos sobre la microcirculación<sup>14</sup> induce a pensar que los fenómenos observados no son en realidad sino la consecuencia de una neangiogénesis defectuosa.

Prácticamente no existen trabajos en la bibliografía que valoren la intensidad del desarrollo vascular en el tejido cicatrizal ni su afectación por los distintos tratamientos que se pudieran emplear. El objetivo de este trabajo es valorar la intensidad del desarrollo vascular en las cicatrices normales y su posible modificación por la CsA.

## Material y métodos

Se han utilizado 28 conejos de Nueva Zelanda de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 2.000 y 2.500 g, proporcionados por el animalario de la Universidad del País Vasco (UPV). La primera serie (n=7) se destinó al estudio de la línea alba normal. En la segunda (n=7) se estudió la vascularización de las cicatrices sobre la línea alba al séptimo día de producida la lesión. En la tercera (n=7) se cuantificó la vascularización de las cicatrices (día 7) tratadas con CsA (20 mg/kg/día i.p. desde la víspera de la intervención hasta el día del sacrificio). Una cuarta serie (n=7) fue destinada al estudio de las cicatrices (día 7) tratadas con el vehículo utilizado para la CsA (etanol anhidro e Intralipid 10 % en proporción 1/10).

Los animales fueron premedicados con Combelén® (0,10 ml/kg i.m.). La anestesia se indujo con Ketamina® (50 mg/kg i.m.) y diazepam (2,5 mg/kg i.m., hasta un máximo de 5 mg). Tras practicar una pequeña incisión laparotómica de aproximadamente 4 cm de longitud, la pared abdominal se cerró con sutura continua de Vitalon 3/0 (How Medica Inc.). A continuación se cerró la piel con sutura continua de seda 3/0, y los animales se introdujeron en sus jaulas, proporcionándoseles pienso y agua *ad libitum*.

Todos los animales fueron sacrificados al séptimo día mediante una sobredosis barbitúrica, siguiendo las normas dictadas por el Real Decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para experimentación. A continuación se extrajeron las cicatrices de la línea alba fijándose las muestras en formol al 10 % para su posterior inclusión en parafina. De cada muestra se obtuvieron tres secciones histológicas de 5 µ de espesor que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

Para realizar los estudios histológicos se ha utilizado un equipo compuesto por un microscopio óptico, una lente de proyección (Mipro 125 mm Kpl, Carl Zeiss) y una mesa digitalizadora (DT 1.000 Graphtec, Tokio) controlada por un microprocesador (Olivetti M-20).

Se han valorado tres campos de 622 µ de diámetro (salvo en los casos en los que el tamaño de la muestra no ha permitido considerar más que uno o dos). Utilizando un objetivo 32x se proyecta la imagen sobre una mesa digitalizadora, lo que proporciona un aumento global de 371x. Sobre dicha proyección se dibuja en la mesa digitalizadora el perfil de cada vaso y el de la cicatriz. A partir de estos dibujos, y por un método de integración, se ha calculado la superficie de cada vaso, así como el área vascular total y la correspondiente al tejido cicatrizal. Estas medidas de superficie vienen dadas en unidades arbitrarias (UA) de área, idénticas para todas las cuantificaciones realizadas. Se obtiene así el porcentaje de área cicatrizal ocupada por

TABLA 1. Porcentaje del área tisular ocupada por vasos

Línea alba	Cicatriz			
	Control	Excipiente	CsA	
0,6680	3,9890	2,3810	2,9720	
0,1960	2,9990	3,8170	4,3880	
0,5600	3,6440	3,4330	3,2860	
0,4240	3,9700	2,4950	5,7390	
0,4470	1,6600	2,3270	3,4270	
0,1290	4,3910	3,0310	4,7210	
0,4100	3,4000	3,7360	4,0880	
$\bar{x}$	0,4049	3,4360	3,0310	4,0890
DE	0,1894	0,9030	0,6431	0,9610

TABLA 2. Análisis estadístico

	CsA	Excipiente	Control
Línea alba	0,0022	0,0022	0,0022
Control	0,3711	0,3067	
Excipiente	0,0736		

Comparación de los porcentajes de área vascular en las cuatro series experimentales (línea alba normal, y cicatrices). Valores de la p obtenidos mediante el test de la suma de rangos.

vasos así como el número de vasos de cada cicatriz y la superficie de cada uno de ellos.

Se ha cuantificado el porcentaje de área vascular sobre el área cicatrizal total, el número de vasos de cada muestra y la superficie de sección de cada uno de los vasos.

## Análisis estadístico

Atendiendo a la distribución no normal de los resultados, las comparaciones realizadas entre las distintas series experimentales se han llevado a cabo utilizando un test no paramétrico: el test de la suma de rangos. Se han considerado diferencias significativas aquellas con una  $p < 0,05$ .

## Resultados

De los resultados de la cuantificación del área cicatrizal ocupada por vasos (tabla 1) se deduce la escasa vascularización de la línea alba normal, en la que sólo un 0,5 % de la sección histológica se encuentra ocupada por vasos. Por contraposición, este parámetro aumenta de 7 a 10 veces en las cicatrices, no observándose diferencias significativas entre los animales tratados y los no tratados (tabla 2).

Si se estudia la vascularización desde otro punto de vista valorando, en vez del área ocupada, la densidad vascular (es decir, el número de vasos por cada 1000 UA de área), se sigue observando la misma diferencia entre las cicatrices y la línea alba normal (tablas 3 y 4). En este caso son los animales no tratados los que presentan un índice mayor, invirtiéndose lo observado al estudiar el porcentaje de área vascular.

Ante esta aparente discrepancia de los resultados realizamos un estudio de correlación entre estos dos parámetros demostrándose que, salvo en el caso de los animales tratados con el excipiente, no existe una dependencia directa entre ellos (fig. 1). Esta ausencia de correlación exigió la búsqueda de un modo de

TABLA 3. Densidad vascular (número de vasos por 1.000 UA de área) en las diferentes series experimentales

Línea alba	Cicatriz		
	Control	Excipiente	CsA
0,12	1,13	0,42	0,64
0,12	0,48	0,46	0,70
0,09	0,83	0,54	0,50
0,20	0,76	0,79	0,65
0,15	0,99	0,39	0,79
0,07	0,79	0,55	0,82
0,15	0,00	0,72	0,68
$\bar{x}$	0,128	0,711	0,552
DE	0,042	0,373	0,151

TABLA 4. Análisis estadístico

	CsA	Excipiente	Control
Línea alba	0,0022	0,0022	0,0298
Control	0,4062	0,1417	
Excipiente	0,1417		

Comparación de la densidad vascular en las cuatro series experimentales (línea alba normal, y cicatrices). Valores de la p obtenidos mediante el test de la suma de rangos.

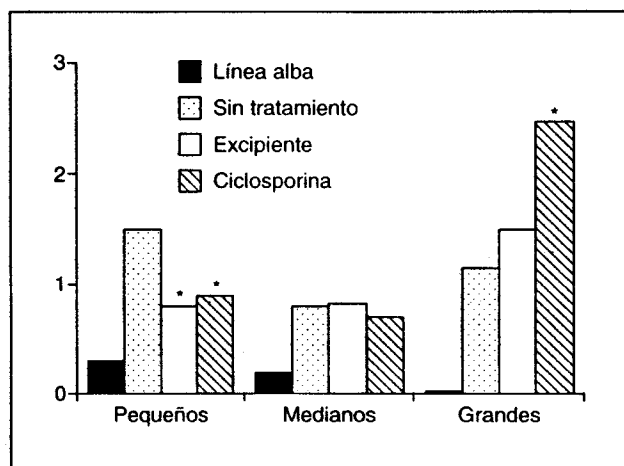


Fig. 1. Estudio de correlación entre el porcentaje de área ocupada por vasos (% AV) y el número de vasos por 1.000 UA (DV) en cada una de los cuatro grupos experimentales. Tan sólo el grupo de animales tratados con excipiente muestra una correlación aceptable entre ambos parámetros. Aquellos valores con una diferencia significativa se marcan con un asterisco.

TABLA 5. Porcentaje de área ocupada por vasos en cada serie experimental, desglosada según los tres tipos de vasos

	Línea alba			Control			Excipiente			CsA		
	P	M	G	P	M	G	P	M	G	P	M	G
	0,19	0,00	0,00	2,29	0,79	0,89	0,54	0,58	1,37	1,07	0,51	1,37
	0,33	0,00	0,00	1,06	0,15	0,45	0,58	0,74	1,06	0,90	0,94	2,88
	0,13	0,00	0,00	1,28	0,91	1,46	0,53	0,94	1,97	0,66	0,77	1,99
	0,13	0,43	0,00	1,34	0,79	2,26	1,39	0,79	1,64	0,95	0,45	1,89
	0,28	0,39	0,00	1,70	1,01	1,27	0,52	0,52	1,29	0,90	1,05	3,79
	0,07	0,18	0,17	1,40	0,92	0,64	0,74	0,77	1,52	1,12	0,51	2,76
	0,23	0,22	0,00	1,48	0,75	1,17	1,00	1,07	1,66	0,73	0,75	2,60
$\bar{x}$	0,19	0,17	0,02	1,50	0,76	1,16	0,75	0,77	1,50	0,90	0,71	2,46
DE	0,09	0,18	0,06	0,39	0,28	0,59	0,32	0,19	0,29	0,16	0,23	0,79

P: pequeños; M: medianos; G: grandes.

cuantificación del desarrollo vascular de la cicatriz que eliminara las diferencias que surgen cuando se consideran número y porcentaje de área ocupada.

En tres piezas escogidas al azar, realizamos unos histogramas de frecuencia en función del tamaño de los vasos, observando una clara tendencia a agruparse los vasos en tres zonas de la gráfica, zonas que quedaban delimitadas por los valores 50 UA y 100 UA (fig. 2). Una vez distribuidos los vasos en tres poblaciones, según su diámetro, se ha calculado el porcentaje de área y la densidad numérica de cada uno de los tipos vasculares en cada pieza histológica estudiada (tablas 5 y 6).

Los estudios de correlación entre porcentaje de área ocupada y densidad numérica en cada tipo vascular (tabla 7) siguen mostrando una falta de correlación en la línea alba normal. Por el contrario, existe una correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de área ocupada y la densidad numérica de cada uno de los tipos, tanto en las cicatrices de los animales no tratados como en los tratados con excipiente o con CsA, con la excepción de los vasos grandes en los animales tratados con excipiente.

Analizando el porcentaje de área ocupada por cada uno de los tres tipos vasculares estudiados, se observa que los tratamientos no han modificado este índice en los vasos de mediano calibre. Sin embargo, el excipiente y la CsA han producido modificaciones significativas en los otros dos tipos vasculares. Así, en los vasos pequeños, se observa una disminución significativa en los animales tratados con excipiente o con CsA. Por el contrario, el excipiente no ha modificado el porcentaje de área ocupada por los vasos grandes, mientras que la CsA lo ha hecho de manera significativa (fig. 3).

Discusión

La acción de la CsA sobre la cicatrización no está todavía aclarada. Así, mientras Fishel et al<sup>12</sup> observaron una disminución de la resistencia tensil y del depósito de hidroxiprolina en cicatrices de heridas practicadas en el dorso de la rata, Eisinger et al<sup>6</sup>, en un modelo similar, refieren no haber encontrado modificaciones en la resistencia tensil, a la vez que Nemlander et al refieren niveles normales de hidroxiprolina<sup>7</sup>.

Recientes trabajos realizados en nuestro laboratorio demuestran una acción clara y negativa de la CsA sobre la cicatrización en sus fases más tempranas<sup>14</sup>, consistente en una significativa disminución de la resistencia tensil cuando ésta se valora en el séptimo día del proceso cicatrizal.

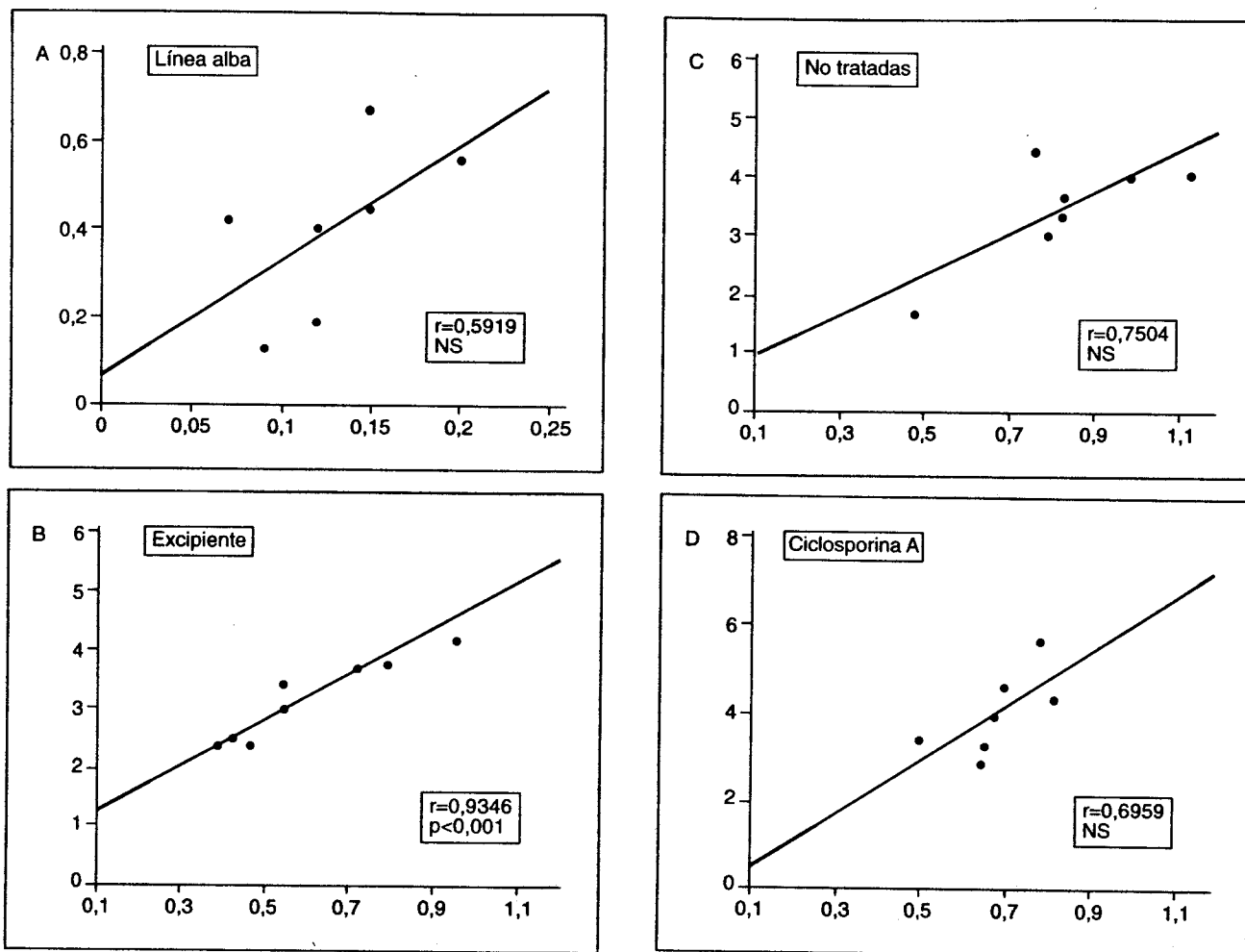


Fig. 2. Histograma de frecuencias de las mediciones de superficie vascular. En el eje horizontal se representa la sección del vaso en UA y en el vertical la frecuencia de cada clase. Se observan tres zonas diferenciadas en la gráfica: la primera, con una gran concentración de valores, se extiende hasta 50 UA. Entre 50 y 100 disminuye el número de vasos, y se hacen mucho más raros a partir de 100. Esta imagen se repitió en los diversos histogramas realizados.

TABLA 6. Densidad vascular (número de vasos por 1.000 U/A) en cada serie experimental, desglosada según los tres tipos de vasos

	Línea alba			Control			Excipiente			CsA		
	P	M	G	P	M	G	P	M	G	P	M	G
	0,12	0,00	0,00	0,96	0,13	0,05	0,28	0,08	0,05	0,49	0,08	0,07
	0,12	0,00	0,00	0,43	0,02	0,02	0,31	0,10	0,05	0,40	0,12	0,17
	0,09	0,00	0,00	0,63	0,13	0,12	0,30	0,14	0,10	0,29	0,10	0,10
	0,14	0,06	0,00	0,55	0,12	0,13	0,64	0,11	0,03	0,48	0,07	0,09
	0,10	0,06	0,00	0,78	0,15	0,15	0,25	0,09	0,05	0,47	0,14	0,18
	0,03	0,03	0,01	0,62	0,13	0,13	0,38	0,12	0,06	0,63	0,08	0,11
	0,12	0,02	0,00	0,66	0,10	0,10	0,52	0,13	0,07	0,46	0,10	0,12
$\bar{x}$	0,102	0,024	0,001	0,661	0,111	0,057	0,382	0,111	0,005	0,460	0,098	0,120
DE	0,035	0,026	0,003	0,169	0,042	0,022	0,144	0,021	0,021	0,102	0,024	0,040

P: pequeños; M: medianos; G: grandes.

La cicatrización de las heridas se inicia, en esencia, por un proceso inflamatorio, y por ello es muy sensible a las posibles modificaciones del desarrollo vascular<sup>15</sup>. Dentro de la bibliografía revisada, tan sólo en un trabajo se valora la intensidad del desarrollo vascular en el tejido cicatrizal. Para ello, Nemlander

et al<sup>7</sup> determinaron la cantidad de hemoglobina presente en cicatrices del dorso de la rata. Esta técnica presenta el inconveniente de ser una estimación indirecta, ya que, además de reflejar la cantidad de vasos presentes, se ve influida por las condiciones hemodinámicas de la zona en el momento del estudio.

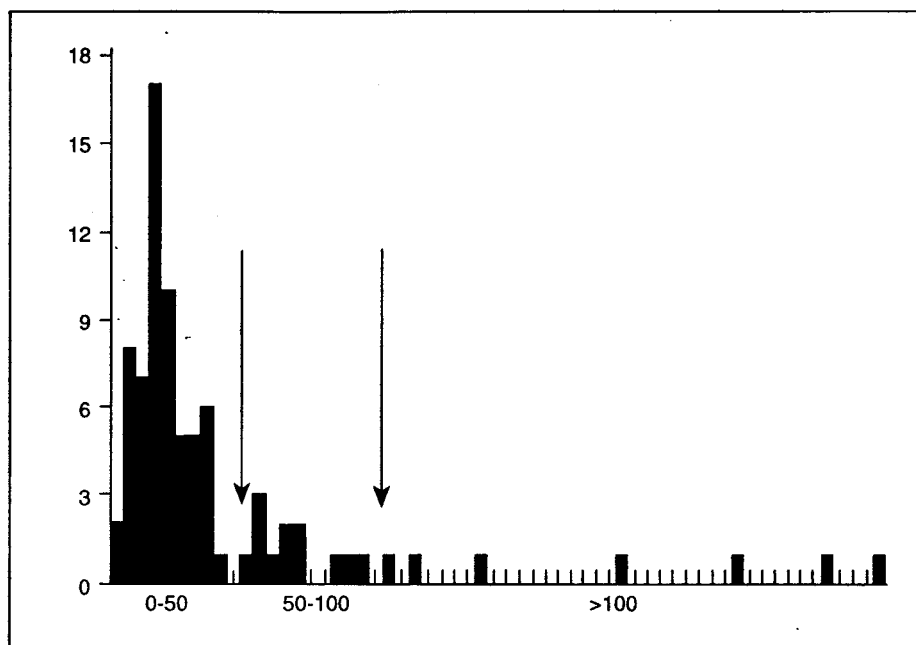


Fig. 3. Porcentaje de área ocupada por vasos (%AV) en cada tipo vascular de cada grupo experimental.

TABLA 7. Estudio de correlación entre el porcentaje de área vascular y la densidad vascular en cada serie experimental: en su conjunto (global; [crf. fig. 1]) y para cada población vascular

	Global	Pequeños	Medianos	Grandes
Línea alba	0,5919	0,5101	0,9807	1,0000
Cicatriz control	0,7504	<b>0,9702</b>	<b>0,9837</b>	<b>0,9548</b>
Excipiente	<b>0,9348</b>	<b>0,9897</b>	<b>0,8930</b>	0,6193
CsA	0,6959	<b>0,8252</b>	<b>0,9885</b>	<b>0,9166</b>

En negrita aquellos valores de la r con significación estadística para una p < 0,05.

El método diseñado en nuestro trabajo constituye una mejor aproximación al reflejar el porcentaje de superficie de sección histológica ocupada por vasos, y este parámetro no se ve afectado por las condiciones hemodinámicas. De hecho, tal y como se detalla en los resultados, ha sido posible objetivar la existencia de tres poblaciones vasculares que presentan comportamientos distintos frente a los tratamientos empleados.

Según se desprende de nuestros resultados, la CsA aumenta la vascularización en las cicatrices, cuando ésta se estudia en el séptimo día de su evolución. Bien es cierto que este efecto no llega a alcanzar significación estadística (tabla 1), pero sí queda claro que la CsA no disminuye este parámetro frente a los controles.

Al analizar separadamente cada una de las tres poblaciones, se observan distintos comportamientos. Llama la atención que en los animales tratados con CsA disminuye el %AV correspondiente a vasos pequeños. Ahora bien, el hecho de que se produzca el mismo fenómeno en los tratados con excipiente, sin que en ellos se modifiquen ni la resistencia tensil ni la densidad fibroblástica, permite suponer que estas variaciones no afectan al proceso cicatrizal.

Por otra parte, el área ocupada por vasos de calibre intermedio no se modifica con ninguno de los tratamientos. En cambio, con la administración de CsA se observa un claro incremento en el %AV correspondiente a vasos de diámetro superior a 100 UA.

Es precisamente este aumento el responsable del efecto observado al analizar globalmente el %AV.

Así pues, a pesar de la complejidad y falta de concordancia de los resultados obtenidos, valorados éstos en su conjunto, se sugiere que la CsA, lejos de alterar las tramas vasculares, mejora la irrigación del tejido cicatrizal, al menos en las etapas iniciales del proceso. Así pues, su efecto negativo sobre la resistencia tensil y la proliferación fibroblástica no puede achacarse a un defecto en la neangiogénesis.

#### Agradecimiento

La ciclosporina A utilizada en este trabajo ha sido gentilmente suministrada por Sandoz, Ltd.

#### Bibliografía

1. Carrico TJ, Mehrhof AJ, Cohen IK. Biología de la cicatrización. Clin Quir North Am (ed. esp.) 1984; 4:721-735.
2. Grinnell F. Fibronectin and wound healing. J Cell Biochem 1984; 26:107-116.
3. Calne RY, White DJG, Thiru S et al. Cyclosporin-A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. Lancet 1978; 23:1.323-1.326.
4. Van Story-Lewis PE, Tenenbaum HC. Glucocorticoid inhibition of fibroblast contraction of collagen gels. Biochem Pharmacol 1986; 35:1.283-1.286.
5. Benson SC, Luvalle PA. Inhibition of lysyl oxidase and propyl hydroxylase activity in glucocorticoid treated rats. Biochem Biophys Res Commun 1981; 99:557-561.
6. Eisinger DR, Sheil AG. A comparison of the effects of cyclosporin A and standard agents on primary wound healing in the rat. Surg Gynecol Obstet 1985; 160:135-138.
7. Nemlander A, Ahonen J, Wiktorowicz K, Von Willebrand E, Hekali R, Lalla M, Hayry P. Effect of cyclosporine on wound healing. Transplantation 1983; 36:1-6.